HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on T-cell exhaustion mediated by immunoinhibitory receptors in chronic infections in cattle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岡川, 朋弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12173号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62081
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Okagawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：岡川　朋弘
Name　Tomohiro Okagawa

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on T-cell exhaustion mediated by immunoinhibitory receptors in chronic infections in cattle

（牛の慢性感染症における免疫抑制受容体を介したT細胞の疲弊化に関する研究）

細胞性免疫は、細胞内寄生菌やウイルスの排除に不可欠な免疫応答である。しかしながら慢性感染症においては、多くの病原体が細胞性免疫の中心を担うT細胞を機能的に疲弊化させることで、宿主の免疫応答を回避している。T 細胞の疲弊化とは、細胞表面に免疫抑制受容体 programmed death 1 (PD-1)、lymphocyte activation gene 3 (LAG-3)、T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3) などが過剰発現することにより引き起こされ、結果として細胞増殖や生存、サイトカイン産生、細胞傷害性といったT細胞の機能が抑制される。しかしその一方で、免疫抑制受容体とそのリガンドとの結合を特異的抗体によって阻害することで、疲弊化T細胞が再活性化され、本来発揮するべきエフェクター機能を回復できることも知られている。そのため様々な研究で、免疫抑制因子に対する特異抗体の慢性感染症治療への応用が試みられている。

本稿では、ヨーネ病、アナプラズマ症、牛白血病といったウシの慢性感染症を対象として、各感染症の病態進行に及ぼす免疫抑制受容体の免疫学的役割を解析した。さらに、ウシの慢性感染症に対する臨床応用を目指して、PD-1 と LAG-3 に特異的な治療用抗体を樹立し、その治療効果を検討した。

第1章：ヨーネ菌の実験感染牛では、持続感染後期においてT細胞応答が徐々に疲弊化していくことがひとつの特徴である。本章ではヨーネ菌の持続感染牛モデルを用いて、PD-1 と LAG-3 の発現解析および機能解析を行った。ヨーネ菌持続感染牛において、PD-1 は腸間膜リンパ節の $CD8^+$ T 細胞で、LAG-3 は末梢血中の $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞で、非感染群に比べて発現量が上昇していた。また、ヨーネ菌の主な感染細胞であるマクロファージにおいて、PD-1、LAG-3 のリガンドである PD-ligand 1 (PD-L1) および MHC クラス II 分子の発現が認められた。さらに、リンパ球に抗 LAG-3 抗体を添加しリガンドとの結合を阻害すると、ヨーネ菌特異的 $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞が活性化され、インターフェロン-γ (IFN-γ) 産生量が増強された。これらの結果より、LAG-3 が主にヨーネ菌特異的T細胞の疲弊化には関与しており、ヨーネ病の発症を予防する新たな治療標的となりうることが示唆された。

第 2 章：以前の研究により、*Anaplasma marginale* 感染牛では感染後 4〜6 週までに抗原特異的 $CD4^+$ T 細胞が急激に疲弊化・枯渇し、急性感染期におけるアナプラズマの増殖と臨床症状を助長することが知られていた。そこで本章では、*A. marginale* の急性感染期における PD-1 および LAG-3 の発現動態に着目し、抗原特異的 T 細胞の疲弊化を引き起こす分子機序の解明を試みた。*A. marginale* 外膜タンパク質をウシに 4 回免疫し抗原特異的な T 細胞応答を誘導した上で、同菌株を接種した。すると以前の研究と同様に、アナプラズマ特異的な T 細胞応答が感染後 5 週以降は著しく抑制された。このとき同時に臨床症状 (菌血症および貧血) も顕著に認められ、急性感染が 5 週目でピークを迎えた。発現解析の結果、$CD4^+$または $CD8^+$ T 細胞中の $PD\text{-}1^+LAG\text{-}3^+$ T 細胞 (重度に疲弊化した T 細胞) が感染後徐々に増加し、感染 5 週目でピークに達した。さらに、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、および抗 LAG-3 抗体を添加し、リンパ球における結合阻害試験を行うと、アナプラズマ特異的な T 細胞応答が再活性化された。以上より、*A. marginale* の急性感染期では $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞に PD-1 と LAG-3 が共発現することで、急激な特異的 T 細胞応答の疲弊化を引き起こすことが明らかになった。

第 3 章：牛白血病ウイルス (BLV) は、感染牛の一部に B 細胞性リンパ腫である牛白血病を引き起こす。また、牛白血病の前段階であるリンパ球増多症（B 細胞の非腫瘍性増殖）を呈した牛は T 細胞が疲弊化状態に陥ることが示唆されており、このことが BLV 感染牛における生産効率の低下や病態進行の原因であると考えられている。そこで本章では BLV 感染症において、3 種類の免疫抑制受容体 PD-1、LAG-3、TIM-3 の発現解析を行い、それらの発現が病態進行に及ぼす影響を調べた。その結果、牛白血病発症牛の $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞中には $PD\text{-}1^+LAG\text{-}3^+$ 疲弊化 T 細胞が多く認められた。また、*Tim-3* mRNA は BLV 感染に伴い $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞での発現が上昇していた。さらに、リンパ球における PD-1 および LAG-3 の結合阻害を行うと、T 細胞からの IFN-γ 産生量が増強された。結果として、牛白血病発症牛では $PD\text{-}1^+LAG\text{-}3^+$ T 細胞が増加することで、T 細胞応答が疲弊化することが示された。また、BLV 感染症の病態進行の過程には別の免疫抑制受容体 TIM-3 も関与することが示唆された。

第 4 章：第 1〜3 章により、PD-1 や LAG-3 などの免疫抑制受容体がヨーネ病、アナプラズマ症、牛白血病の病態進行に関与することが示された。そこで本章では、ウシの慢性感染症に対する新規制御法を開発することを目的として、治療用抗 PD-1 抗体および治療用抗 LAG-3 抗体を新たに樹立した。樹立した治療用抗 PD-1 抗体は、抗 PD-1 ラット抗体と同程度の結合親和性と結合阻害活性を有していた。また、治療用抗 LAG-3 抗体についても抗 LAG-3 ラット抗体と同程度の結合性を示した。さらに、BLV 感染牛における治療用抗 PD-1 抗体の臨床試験を実施したところ、抗体投与後に BLV 特異的 $CD4^+$ T 細胞を中心とした T 細胞機能の活性化が認められ、結果としてリンパ球中の BLV プロウイルス量が顕著に低下した。この結果より、治療用抗 PD-1 抗体は、BLV 感染症の病態進行を遅らせる新規制御法となりうる可能性が示された。

本研究により、T 細胞の疲弊化はウシの慢性感染症に共通して認められる特徴であり、主に PD-1、LAG-3 の発現上昇により引き起こされることが明らかになった。T 細胞の疲弊化により、ヨーネ病では臨床症状の発症、アナプラズマ症では急性期の臨床症状と細菌の潜伏感染、BLV 感染症では白血病の発症が促進されていると考えられる。さらに、PD-1 および LAG-3 とリガ

ンドとの結合を抗体によって阻害することにより各種抗原に対する T 細胞応答が再活性化された。治療用抗体のさらなる改良は不可欠だが、今後、本研究を基にした免疫抑制受容体に対する抗体医薬がウシの様々な感染症に対する新規制御法として応用されることが期待される。